

УДК 576.895.132 : 595.7 : 577.1

# ПОГЛОЩЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ ЭНТОМОНЕМАТОДОЙ NEOAPLECTANA GLASERI ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ

Е. А. Клещинова

Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени институт гельминтологии  
имени К. И. Скрябина, Москва

При использовании радиоизотопных методов исследования изучено поглощение нейтральных, основных и кислых аминокислот энтомонематодами в процессе развития в химически определенной среде. Установлено, что процесс поглощения аминокислот является активным, интенсивность которого меняется в динамике развития нематод.

Нематоды рода *Neoapectana* обладают высокой патогенной активностью для хозяина, сравнительно коротким циклом развития и хорошей адаптацией к неблагоприятным условиям окружающей среды. В настоящее время их успешно используют в экспериментах по защите растений от вредных насекомых (Веремчук, Данилов, 1976; Dutky e. a., 1964). Для применения неоаплектан в биологических методах борьбы против насекомых — вредителей сельскохозяйственных культур — необходимы значительные количества их биомассы. Как за рубежом, так и в нашей стране неоаплектан культивируют на различных плотных и жидких искусственных питательных средах (Тараканов, 1977, 1979; Вюшгер e. a., 1971, и др.). Однако существующие культуральные среды являются обобщающими, но не оптимальными. Для создания наиболее рациональных сред необходимо детальное изучение пищевых потребностей неоаплектан и особенностей обмена веществ. Изучение последних наиболее целесообразно проводить в аксенных условиях с использованием химически определенной среды.

Из литературы известно, что *N. glaseri* для своего развития нуждаются в большом количестве и разнообразии аминокислот. Причем эти гельминты более активно потребляют азотсодержащие вещества в первые дни культивирования (Jackson, 1969). Однако сведений о том, какие именно аминокислоты среды потребляются гельминтами наиболее интенсивно и в какие сроки культивирования, в литературе мы не обнаружили. Исходя из этого, целью нашей работы явилось изучить динамику потребления аминокислот *N. glaseri* в процессе развития в синтетической среде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуру неоаплектан получали путем аксенного культивирования гельминтов в пробирках на мясопептонном агаре с добавлением стерильных кусочков печени или почек кролика (Тараканов, Андреева, 1974). Нематод перед опытом промывали несколько раз стерильным физиологическим раствором и 0.5 мл густой суспензии, содержащей около 16 тыс. инвазионных личинок, вносили в 1 мл химически определенной среды (Клещинова, 1980), содержащей гидролизат белка водоросли *Chlorella vulgaris* с мечеными по  $^{14}\text{C}$  аминокислотами. Подсчет гельминтов проводили под бинокулярным микроскопом МБС-1 методом разведения. Гельминтов инкубировали в аппарате для культивирования тканей во вращающихся пробирках при 23°; скорость вращения 12 об./час, угол наклона 5°. Содержание аминокислот в среде определяли через 5, 24, 48, 144 и 216 ч,

выбранные согласно наблюдаемому нами циклу развития неоаплектан при их культивировании в синтетической среде (Клещинова, 1980). Контролем служила среда, содержащая мертвых нематод, (ноль часов инкубации). Поглощение аминокислот определяли по разности между содержанием их в контрольной среде и среде после культивирования гельминтов.

Аминокислоты среды разделяли методом тонкослойной хроматографии на ионообменных пластинах «Фиксион 50×8» («ХИНОИН», ВНР) одномерно, в цитратном буфере рН 3.3 при 45° (Дэвени, Гергей, 1976). Непроявленные хроматограммы автордиографировали в течение 4.5 месяцев. Пятна, полученные после проявления радиоавтографов, идентифицировали при сравнении с проявленными свидетелями аминокислот. При сопоставлении хроматограммы с ее радиоавтографом определяли зоны с мечеными аминокислотами. Эти участки вырезали и вместе с подложкой помещали во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости (5 г РРО+0.25 г РОРОР на 1 л толуола). Радиоактивность во флаконах определяли на автоматическом спектрометре «Марк II» (Сёрл Аналитик Корпорейшен, США). Поправку на гашение проводили по методу отношения каналов с внешним стандартом <sup>133</sup>Ba (Baillie, 1960).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты качественного и количественного определения потребления нейтральных, основных и кислых аминокислот среды в процессе роста и развития неоаплектан представлены в таблице. Из приведенных данных видно, что среди нейтральных неполярных аминокислот среды в первые 5 ч происходит значительное потребление всех аминокислот, однако наиболее активно поглощается лейцин. Во 2-м (5—24 ч) и 3-м (24—48 ч) периодах развития мы наблюдали выделение аланина, а в 4-м (48—144 ч) — пролина. В 4-м периоде культивирования потребление возобновилось почти для всех аминокислот и в большей степени опять поглощался лейцин. Интересно отметить, что для таких аминокислот, как валин, пролин и изолейцин, содержания которых в исходной среде близки, потребление в процессе культивирования совершенно различно. Кроме того, молекулярный вес валина и пролина почти одинаков. Этот факт, а также выделение аминокислот в окружающую среду, свидетельствует о том, что поглощение аминокислот у неоаплектан является активным процессом и не зависит от молекулярного веса и исходного содержания в среде. Среди нейтральных полярных аминокислот на протяжении всего времени культивирования активно потреблялись серин+треонин, причем основное потребление происходило в первые 5 ч. Тирозин активно поглощался только в период 5—24 ч. Из основных аминокислот лизин потреблялся активнее, чем аргинин. Причем его потребление было наиболее интенсивным в первые 5 ч (в 4.5 раза больше, чем в 4-м периоде). Динамика поглощения аспарагиновой и глутаминовой кислот — представителей кислых аминокислот — была различной. Также в первые 5 ч интенсивно поглощалась глутаминовая кислота. В последующие периоды культивирования содержание этой аминокислоты оставалось без значительных изменений. Анализ данных динамики изменения содержания аспарагиновой кислоты в среде показал значительное ее выделение в 3-м периоде.

Таким образом, из нейтральных неполярных аминокислот неоаплектаны на протяжении всего периода культивирования в большей степени поглощали лейцин. Из нейтральных полярных интенсивно потребляли серин+треонин, причем поглощение этих аминокислот было достоверным для всех изученных периодов культивирования. Из основных аминокислот гельминты в большей степени потребляли лизин, а из кислых — глутаминовую кислоту. Наши результаты по потреблению аминокислот неоаплектанами согласуются с литературными данными. Так, цестоды при инкубации с гидролизатом казеина активно потребляли также глутаминовую кислоту, лизин и лейцин, а свиные аскариды и аскариды кур — лизин и глутаминовую кислоту (Дубовская, 1973; Бердыева, 1972; Бердыева, Дрюченко, 1972).

К 216-му часу культивирования содержание большинства аминокислот в культуральной среде уменьшилось почти на 50%. Это, по всей видимости, является одной из причин задержки развития первого поколения гельминтов,

Потребление аминокислот нематодами *Neoplectana glaseri* соответственно периодам развития в синтетической среде

Период развития (в час)	Потребление аминокислот (в мкмольх/мл)					
	нейтральные неполярные					
	фенил- аланин	лейцин	изолейцин	валин	пролин	аланин
0—5	1.71 $P \leq 0.05$	6.20 $P \leq 0.05$	2.78 $P \leq 0.01$	1.36 $P \leq 0.05$	2.23 $P \leq 0.01$	4.48 $P \leq 0.05$
5—24	-0.31 $P > 0.05$	0.14 $P > 0.05$	3.09 $P \leq 0.01$	0.13 $P > 0.05$	1.77 $P \leq 0.01$	-2.02 $P \leq 0.05$
24—48	-0.28 $P > 0.05$	-0.65 $P > 0.05$	-0.05 $P > 0.05$	0.53 $P > 0.05$	-0.36 $P > 0.05$	-1.17 $P \leq 0.05$
48—114	0.49 $P > 0.05$	2.60 $P \leq 0.05$	0.31 $P \leq 0.05$	1.12 $P \leq 0.05$	-0.51 $P \leq 0.05$	1.41 $P > 0.05$
144—216	0.21 $P > 0.05$	1.35 $P > 0.05$	-0.15 $P > 0.05$	0.58 $P \leq 0.05$	1.61 $P \leq 0.05$	0.08 $P > 0.05$
Суммарное поглоще- ние за 216 ч, в %	63	52	81	39	68	0

Продолжение

Период развития (час)	Потребление аминокислот (в мкмольх/мл)						
	нейтральные полярные			основные		кислые	
	тирозин	глицин	серин + треонин	аргинин	лизин	глутами- новая кислота	аспара- гиновая кислота
0—5	-0.40 $P > 0.05$	0.88 $P \leq 0.01$	6.84 $P \leq 0.01$	0.40 $P \leq 0.01$	5.49 $P \leq 0.01$	7.76 $P \leq 0.01$	0.46 $P > 0.05$
5—24	2.53 $P \leq 0.01$	0.11 $P > 0.05$	0.94 $P \leq 0.05$	0.43 $P \leq 0.05$	-0.54 $P > 0.05$	0.34 $P > 0.05$	0.03 $P > 0.05$
24—48	-0.19 $P > 0.05$	-0.29 $P > 0.05$	1.46 $P \leq 0.05$	-0.05 $P > 0.05$	-0.20 $P > 0.05$	-0.80 $P > 0.05$	-4.64 $P \leq 0.05$
48—114	0.37 $P \leq 0.05$	0.20 $P > 0.05$	1.50 $P \leq 0.05$	0.37 $P > 0.05$	1.20 $P \leq 0.05$	2.70 $P > 0.05$	3.71 $P \leq 0.05$
144—216	0.08 $P > 0.05$	0.06 $P > 0.05$	-0.22 $P > 0.05$	0.07 $P > 0.05$	0.60 $P > 0.05$	1.12 $P > 0.05$	0.16 $P > 0.05$
Суммарное поглоще- ние за 216 ч, в %	67	45	79	53	59	53	0

П р и м е ч а н и е. Минус — выделение аминокислоты.

так как отмечено, что при разведении первоначальной концентрации аминокислот компенсирующими солями на 50% развития нематод не происходит (Jacksen, 1966).

Из результатов нашей работы видно, что в процессе развития гельминтов происходило выделение некоторых аминокислот. Последние могут быть продуктами экскреции или же аминокислотами, утраченными вследствие нарушения функции организма. Побочные продукты обмена бактерий как источник органических веществ в наших опытах были исключены. До 144 ч культивирования более 90% нематод были активны, поэтому возможное влияние просочившихся из тел мертвых нематод аминокислот было незначительным. В период отрождения 1-го поколения гельминтов возможен выход молодых личинок путем разрыва тела самки. В результате этого, очевидно, часть аминокислот переходила в раствор благодаря диффузии из погибших нематод и лизису мертвых тканей. Этим фактом, возможно объяснить то, что в период культивирования 144—216 ч для многих аминокислот отсутствовало достоверное потребление.

Наши результаты по выделению аспарагиновой кислоты, аланина и пролина неоаплектанами согласуются с литературными данными, полученными для других гельминтов (Говорова, 1965; Дрюченко, Бердыева, 1972; Myers *et al.*, 1965, и др.). Так, например, при изучении трематод обнаружено выделение в инкубационную среду также аспарагиновой кислоты, аланина и пролина (Senft, 1963; Smyth, 1966; Richards, 1970), а при изучении транспорта аминокислот у свиной аскариды — значительную экскрецию аланина (Павлов и др., 1970). Однако вопрос о том, являются ли аминокислоты естественным продуктом выделения или это результат адаптационных возможностей гельминтов до конца не решен.

При обобщении результатов по динамике потребления всех изученных групп аминокислот согласно периодам развития неоаплектан была обнаружена общая тенденция, которая наиболее ярко выражена для нейтральных неполярных аминокислот. Поглощение аминокислот соответствует циклу развития неоаплектан в синтетической среде. До помещения инвазионных личинок в культуральную среду они находились в течение 5 дней при 4° в анабиозе, необходимом для «отдыха» от непрерывного культивирования на питательных средах (Jackson, 1969). После помещения личинок в благоприятные условия они быстро вышли из анабиотического состояния и перешли к активному образу жизни, интенсивно потребляли питательные вещества среды. Об этом свидетельствовала активная подвижность и значительное потребление аминокислот, которые мы наблюдали в первые 5 ч культивирования неоаплектан. Этот процесс продолжался до 24 ч. В последующие 24—48 ч происходит постепенная стабилизация обменных процессов нематод. В период совершения 3-й линьки и перехода в 4-ю стадию развития потребление аминокислот приостанавливалось, а некоторые даже выделялись (аланин, аспарагиновая кислота). С 48—144 ч нематоды линяют 4-й раз, значительно увеличиваются в размерах и достигают половой зрелости. Гельминты в это время потребляют большое количество питательных веществ, в том числе и аминокислот, являющихся основным строительным материалом белковых молекул. В этот период времени мы наблюдали возобновление потребления большинства аминокислот, продолжавшееся (в меньшей степени) и в последний период культивирования.<sup>1</sup>

### Л и т е р а т у р а

- Бердыева Г. Т. Поглощение аминокислот аскаридиями при содержании их в различных аминокислотных средах. — Изв. АН ТССР, сер. биол. н., 1972, N 5; с. 74—77.
- Бердыева Г. Т., Дрюченко Е. А. Потребление *Ascaris suum* аминокислот из полноценных и неполноценных смесей аминокислот. — Изв. АН ТССР, сер. биол., 1972, № 3, с. 28—31.
- Веремчук Г. В., Данилов Л. Г. Энтомопатогенные нематоды. — Защита растений, 1976, № 8, с. 22.
- Говорова С. В. Конечные продукты азотистого обмена *Ascaridia galli*. — Матер. науч. конф. Всесоюз. о-ва гельминтол. Ч. 2. 1965, с. 67—70.
- Дрюченко Е. А., Бердыева Г. Т. Потребление нематодами некоторых аминокислот из гидролизата казеина. — Паразитология, 1972, т. 6, вып. 4, с. 356—359.
- Дубовская А. Я. Особенности некоторых сторон белкового обмена у цестод — паразитов позвоночных различных классов. Дис. канд. биол. наук. М., 1973. 164 с.
- Дэвени Т., Гергей Я. Ионообменная хроматография в фиксированном слое ионообменника. — В кн.: Аминокислоты, пептиды и белки. М., Мир, 1976, с. 242—264.
- Клещинова Е. А. О возможности развития *Neoaplectana glaseri* в синтетической среде. — В кн.: Гельминты насекомых, М., Наука, 1980, с. 72—75.
- Павлов А. В., Шишова-Касаточкина О. А., Волинская К. Б. О транспорте аминокислот у нематод. — Паразитология, 1970, т. 4, вып. 3, с. 231—235.
- Тараканов В. И. Методика культивирования *in vitro* нематоды *Neoaplectana glaseri*. — Бюл. Всес. ин-та гельминтол., 1977, т. 19, с. 81.
- Тараканов В. И. Методика непрерывного аксенного культивирования энтомопатогенной нематоды *Neoaplectana glaseri*. — Бюл. Всес. ин-та гельминтол., 1979, № 25, с. 78—88.
- Тараканов В. И., Андреева Г. Н. Методика аксенного выращивания нематод рода *Neoaplectana*. — Бюл. Всес. ин-та гельминтол., 1974, т. 13, с. 108—114.

<sup>1</sup> Мы выражаем глубокую благодарность с. н. с. радиоизотопной лаборатории отдела молекулярной биологии паразитов Института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского А. А. Лурье за большую консультативную помощь, оказанную нам при выполнении данной работы.

- Baillia L. A. Determination of liquid scintillation counting efficiency by pulse height-shift. — Inter. J. Applied. Rad. and Isotopes, 1960, vol. 8, N 1, p. 1—7.
- Buecher E. J., Hansen E. L. Mase culture of axenic nematodes using continuous aeration. — J. Nematol., 1971, vol. 3, N 2, p. 199—200.
- Dutky S. K., Thompson J. V., Contwell G. E. A technique for the masspropagation of the DD-136. — Nematol. J. Insect. Pathol., 1964, vol. 6, N 4, p. 417—422.
- Jackson G. J. Helminth physiology: stage and species differences in culture. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1966, 139, art 1, p. 91—98.
- Jackson G. J. Nutritional control of nematode development. Germfree biology: experimental and clinical aspects. — Adv. Exp. Med. Biol., 1969, vol. 3, p. 333—341.
- Kleshchinova E. A., Tarakanov V. I. Culture of *Neoaplectana glaseri* in a medium of chemically defined content. — 4th Congr. Parasitol., Warszawa, Poland, sect. A, 1978, p. 59.
- Myers R. F., Krusberg L. R. Organic substance discharged by plant parasitic nematodes. — Phytopathology, 1965, vol. 55, N 3, p. 429—437.
- Richards R. J. The leakage and transamination of amino acids in vitro by the germinal sacs of marie digined. — J. Helmintol., 1970, vol. 44, N 2, p. 231—241.
- Senft A. W. Observations on amino acid metabolism of *Schistosoma mansoni* in a chemically defined medium. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1963, vol. 113, art 1, p. 72—288.
- Smyth M. D. The physiology of trematodes. Edinburgh, London. Oliver, Boyd, 1966. 256 p.

---

#### THE ABSORPTION OF AMINO ACIDS BY ENTOMONEMATODE NEOAPLECTANA GLASERI FROM CULTURAL MEDIUM DURING DEVELOPMENT

E. A. Kleshchinova

By means of radioisotopic methods studies were conducted of the absorption of 14 amino acids from the cultural medium by entomonematodes of *N. glaseri* during their development. The absorption of amino acids by neoaplectans is an active process which correlates with the developmental cycle of nematodes. The greatest consumption of amino acids is observed within the first five hours of cultivation and during the period of intensive growth and attaining sexual maturity. Within 216 hours of cultivation the amount of most amino acids in the medium fell almost by 50%; glutaminic acid, serine+threonine, leucine, lysine and isoleucine were consumed most intensively. According to the decrease in the consumption rate other amino acids can be arranged in the following succession: proline, valine, phenylalanine, arginine, glycine. During their development nematodes excrete asparaginic acid, alanine, and to a lesser extent proline, which apparently are end products of nitrogenous metabolism of these helminths.

---